

辣根过氧化物酶标记葡萄球菌 A 蛋白 的简易过碘酸钠法

周惠珍 龚志术* 乔伯英 王洪海 张晓平

(解放军总医院免疫室 北京)

辣根过氧化物酶(HRP)标记葡萄球菌 A 蛋白(SPA)的方法多为过碘酸钠法^[1,2]。1982 年薛采芳等^[3]采用过碘酸钠改良法获得满意效果。我们依照 Wilson 等^[4]报道的 HRP 标记抗体的方法,加以改良制备了 HRP-SPA 结合物,并与过碘酸钠改良法作了比较,效果良好。

采用本法制备 HRP-SPA 国内外尚未见有类似报道。本法的主要特点是将 HRP 在低 pH4.4 下进行过碘酸钠氧化,省去经典法中用二硝基氟苯封闭 HRP 步骤,从而有效防止 HRP 的自

* 武汉军区军医学校。

身结合,减少 HRP 的部份失活,提高了结合物的应用滴度。我们采用透析法代替 Wilson 原法中用 Sephacryl S-200 层析法纯化结合物,使之更加简易、快速。故称其为简易过碘酸钠法。

材 料 和 方 法

(一) 材料

HRP 系美国 Sigma 生产(RZ = 3.2,批号 59 C—9760)和上海生物化学研究所生产(RZ = 3.0,批号 800998)。SPA 系上海生物制品研究所生产的冻干 A 蛋白纯品。

(二) 标记方法

取 HRP 6 mg 溶于 1ml 蒸馏水中,再加入新鲜配制的 0.1 M NaIO₄ 0.2 ml,冰浴下避光缓慢搅拌 20 分钟,对 1 mM pH 4.4 醋酸钠缓冲液透析,4℃ 过夜,其间换液三次,每次 1000 ml。吸出后在缓慢搅拌下加入 0.1 M pH 9.5 碳酸盐缓冲液 0.2 ml,使 pH 上升至 9—9.5,并立即加入用 0.5 ml 0.01M pH 7.4 PBS 溶解的 6 mg SPA 纯品,冰浴下继续避光搅拌 2 小时。加入新鲜配制 0.1 ml NaBH₄(4mg/ml),置 4℃ 2 小时,对 0.1 M pH 7.4 硼酸缓冲液透析,4℃ 过夜,其间换液三次。取出结合物加入甘油最终浓度达 30%, -20℃ 保存。

(三) 测定方法

1. 结合物中 HRP 与 SPA 量的测定: 用英国 SP 1800 紫外分光光度计测定结合物在 280 及 403 nm 波长下的光密度(A),并计算出酶量、A 蛋白量、A₄₀₃ 与 A₂₈₀ 的比值,HRP 与 SPA 的克分子比和酶结合率^[5]。

2. 结合物效价测定: 用 10 μg/ml 纯化人 IgG 包被聚苯乙烯微孔板,以 ELISA 直接法对 HRP-SPA 进行测定,邻苯二胺显色,以 A_{495nm} = 1.0 时的稀释度作为鉴定滴度。

结 果 与 讨 论

(一) 简易过碘酸钠法标记效果

用 Sigma 产 HRP 用本法制备 HRP-SPA,并与改良过碘酸钠法作比较,其结果见表 1 所示。

根据薛采芳等^[5]的报道,按酶标记抗体质量鉴定参数将结合物的质量分为效果一般、效果较好和效果满意等级来判断,表 1 所述结果表明本法制备的 HRP-SPA 达到效果满意水平。本法所得结合物酶量、酶结合率和克分子比值等主要鉴定参数高于改良过碘酸钠法,结合物鉴定滴度为改良过碘酸钠法的 2 倍,说明本法优于改良过碘酸钠法。

表 1 简易过碘酸钠法与改良过碘酸钠法标记效果比较

标记方法	批次	酶量 (mg/ml)	A 蛋白量 (mg/ml)	克分子 比值	A ₄₀₃ 与 A ₂₈₀ 比值	酶结合率 (%)	结合物鉴定 滴度*
简易过碘酸钠法	1	1.02	0.59	3.11	1.67	33.8	1:35,000
	2	1.05	0.63	2.81	1.46	34.9	1:35,000
改良过碘酸钠法	1	0.88	0.71	2.09	1.22	29.0	1:15,000
	2	0.92	0.75	2.06	1.21	31.0	1:15,000

* 检测结合物效价时,用稀释液分别代替反应系统中的抗原、底物及酶结合物均呈阴性反应。

本法制备的 HRP-SPA 性能稳定。我们将 HRP-SPA 作 1:2500 稀释,置 4℃ 于 1 个月应用,其活性与临用时稀释的一样。置 -20℃ 保存 5 个月的 HRP-SPA 活性也未改变。

Wilson 等^[4]认为,在经典过碘酸钠法中,用二硝基氟苯封闭 HRP 的氨基不能完全阻止

HRP 经 NaIO₄ 氧化后的自身结合,而且在 pH 8.0 时 HRP 部分失活。因此,Wilson 等制备酶标抗体,系将 HRP 在低 pH(4.4)下进行 NaIO₄ 氧化,并省去二硝基氟苯封闭步骤,从而提高了结合物的应用滴度。我们的实验证明 Wilson 等建立的方法也适用于制备 HRP-SPA。

(二) 不同比例的 HRP 与 SPA 制得的结合物效果

Wilson 等原法中, HRP 与抗体 (IgG) 按 1:2(或 HRP:Fab' = 1:1) 进行标记, 最后用 Sephacryl S-200 柱层析法纯化结合物以除去

未结合上的游离 HRP 及抗体。我们改用透析法去除游离的 HRP 及 SPA, 并对 HRP 与 SPA 不同比例制得的结合物效果进行了比较, 结果见表 2。

结果表明 HRP 与 SPA 按 1:1 及 1:2 比例

表 2 用不同比例 HRP 与 SPA 制得的结合物效果比较

标记条件	酶 量 (mg/ml)	A 蛋白量 (mg/ml)	克分子比值	酶结合率 (%)	结合物鉴定 滴度
HRP:SPA = 1:1	1.05	0.63	2.61	34.9	1:35,000
HRP:SPA = 1:2	0.72	0.51	2.96	48.0	1:32,000

制得的结合物鉴定滴度基本一致。HRP 与 SPA 按 1:2 制备结合物可节省 HRP。由于 SPA 的分子量为 42,000, 比 IgG 小, 用透析法去除结合物中游离 HRP 与 SPA 效果满意。

(三) 国产及 Sigma 产 HRP 标记效果

HRP 的质量对酶结合物的影响很大。我们对上海生物化学研究所产及 Sigma 产 HRP, 应用本法制备 HRP-SPA 进行了比较。结果列于

表 3。

表 3 表明, 上海生物化学研究所产 HRP 标记效果接近 Sigma 产 HRP, 依据酶标结合物质量鉴定的主要参数判断, 达到满意效果水平。显然它可用于实际工作, 来源方便完全可代替价格昂贵的进口 HRP。

应用本法制备的 HRP-SPA 应用效果好。我们将其用于免疫酶染色法检测 10 例正

表 3 国产及 Sigma 产 HRP 标记 SPA 效果比较

HRP 来源	酶 量 mg/ml	A 蛋白量 mg/ml	克分子比值	酶结合率 (%)	结合物鉴定 滴度
上海生化所	0.98	0.54	1.81	32.5	1:30,000
Sigma	1.05	0.63	2.62	34.9	1:35,000

常人单纯疱疹病毒(HSV-1) IgG 抗体, 结果与间接免疫荧光法平行检测结果一致 (表 4), 工作浓度为 1:200。以 HRP-SPA 为第二抗体, 用 ELISA 法检测副霍乱弧菌可溶性抗原, 也得

到满意效果^[6]。

由于 SPA 具有能与人及多种哺乳动物 IgG 分子 Fc 段相结合的生物学特性, 作为广谱的第二抗体, 已成为应用广泛的免疫试剂。为制备出更为理想的 HRP-SPA, 标记技术尚待进一步提高。本文介绍的简易过碘酸钠法具有简便、快速、高效等特点, 值得采用。

表 4 HRP-SPA 免疫酶法检测正常人血清 HSV-1/IgG 抗体

标本号	HRP-SPA 免疫酶法	免疫荧光法
1	160	160
2	80	80
3	160	160
4	320	160
5	640	640
6	160	320
7	1280	1280
8	320	160
9	640	640
10	320	320

参 考 文 献

[1] Dubois-Dalcq, M. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 25:1201, 1977.
[2] Medore, H. P. et al.: *J. Clin. Microbil.*, 10:529, 1979.
[3] 薛采芳等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2: 125, 1982.
[4] Wilson, M. B. et al.: *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, P. 215, 1978.
[5] 薛采芳等: 第四军医大学学报, 2: 131, 1980.
[6] 龚志杰等: 中国免疫学杂志, 1: 1, 1985.